云 南 植 物 研 究 1994; **16** (3): 263—267
Acta Botanica Yunnanica

金花茶花药愈伤组织的体细胞减数分裂

李懋学 尤瑞麟
(北京大学生物系, 北京 100871)

白文力 程金水
(北京林业大学园林系, 北京 100083)

摘要 金花茶(*Camellia petelotii*)的小孢子单核期花药, 经培养和继代培养 6 个月后的愈伤组织中, 发现有少量体细胞进行减数分裂。在减数第一和第二次分裂中, 同源染色体的配对和分离基本正常, 最后形成四分体。该愈伤组织经石蜡切片和压片观察, 发现其主要由大量的液化细胞和贮藏细胞所组成, 此外, 还有少部分分生细胞。没有发现进一步的分化。其染色体数目, 2n＝30 者占 71.7%, 其余则为非整倍体。

关键词 金花茶, 花药愈伤组织, 体细胞减数分裂

SOMATIC MEIOSIS OF ANTHER CALLUS GULTURE IN CAMELLIA PETELOTII

LI Mao-Xue[1], YOU Rui-Lin[1], BAI Wen-Li[2], CHEN Jing-Shui[2]
([1]*Department of Biology, Peking University*, Beijing 100871)
([2]*Beijing Forestry University*, Beijing 100083)

Abstract It was found that a few cells progress meiosis in an anther callus culture of *Camellia petelotii* (Merr.)Sealy cultured and subcultured for 6 months. The pairing and segregating of homologous chromosomes at the frist and second division of meiosis were conformed with PMC meiosis, and finally, the tetrad were formation. Basec on the analysis of chromosomal morphology and behavior, it was considered as a special somatic meiosis. The speciality and significance of this somatic meiosis were analyzed and discussed. Observation on preparations made with paraffin sectioning and squashing showed that callus clumps composed of some meristematic cell groups, a large quantity of vaculated cells and storge cells, without further differentiation. About 71.1 percent of cells in this callus clumps showed the chromosome number 2n＝30, and the rest cells were aneuploid.

Key words *Camellia petelotii,* Anther callus, Somatic meiosis

在高等植物中, 自然和人工诱导的体细胞染色体减数现象, 已有许多报道[1-4]。但是, 由于其细胞学行为及其分裂后的产物, 与大、小孢子母细胞的减数分裂不同。因此, Riger 等[5]认为它不属于减数分裂 (meiosis) 范畴, 而只能称为体细胞 (染色体) 减数 (somatic reduction)。

在细胞和组织培养中, Mitra 和 Steward[6]曾报道过体细胞染色体配对和拟交叉现象, 但却没有观察到其后续的分裂过程。我们在作金花茶花药愈伤组织的细胞学观察时, 发现了少量体细胞进行减数分裂, 简要报道如下。

1993-07-10 收稿

材料与方法

用于组培的金花茶（*Camellia petelotii*（Merr.）Sealy）[7]花药，采自广西南宁市新竹苗圃，经镜检确认处于小孢子单核期的花药计200枚，再经表面消毒后，接种于MS培养基，附加0.1mg／L 2, 4-D, 50mg／L蔗糖，pH值5.8，琼脂4g／L。培养温度25℃，散射光照。培养1个月后，约60%的花药形成愈伤组织。随即将其转移至下列分化培养基中：MS培养基，附加2mg／L 6-BA, 0.1mg／L IAA，琼脂4g／L。此后每月转移1次，继代培养。6个月后，随机取5瓶愈伤组织进行细胞学观察。

供作细胞分裂过程和行为观察的愈伤组织，用95%乙醇-冰乙酸（3∶1）固定约2小时，转入1mol／L HCl中于60℃处理约10分种，水洗后用苯酚品红染色和压片。供作染色体计数的愈伤组织，则以50ppm放线菌酮水溶液（Cycloheximide）于室温下预处理7小时。固定、解离、染色和压片同上。

石蜡切片按常规方法。切片厚度8μm。铁矾-苏木精染色。

观察结果

愈伤组织的细胞组成

该愈伤组织虽经继代培养6个月，细胞分裂始终保持旺盛的状态，生长速度较快。在解剖镜下观察，未见到有任何器官的分化（图版Ⅰ：1）。石蜡切片观察，其主要是由大量液泡化的，或含淀粉或丹宁等物质的细胞组成，结构比较疏松。此外，在愈伤组织的外沿，则可见到大小不等的分生细胞团（图版Ⅰ：2)。

体细胞染色体数目

根据8块愈伤组织制作的12张制片的观察和统计，可确认其细胞染色体数目者，如表1所示。

表1 金花茶花药愈伤组织的染色体数目

Table 1 The chromosome numbers of anther callus in *Camellia petelotii*

Chr. No.	4	6	7	8	12	15	16	21	28	30
Cell. No.	1	1	2	3	4	10	4	2	8	86
%	0.83	0.83	1.65	2.48	3.30	8.26	3.30	1.65	6.61	71.1

上表所示，该愈伤组织看来并不是由小孢子所衍生的单倍体，而可能是由花药的其它体细胞所衍生而来。2n＝30的染色体形态（图版Ⅰ：3)，与其他作者[8—11]先前所报道的根尖细胞染色体类似。单倍体仅占约8%，其它非整倍性细胞占约21%（图版Ⅰ：4)。

体细胞减数分裂

在所观察的所有愈伤组织中，只在一块愈伤组织的两张制片中观察到体细胞减数分裂。这些进行体细胞减数分裂的细胞，随机散落在其它体细胞之间，其特点是细胞体积明显小于液泡化的成熟体细胞（图版Ⅰ：5)，而与分生细胞大小近似（图版Ⅰ：6)。这是与行减数分裂的小孢子母细胞在细胞大小上的显著差别，小孢子母细胞通常数倍大于分生细胞。

中期Ⅰ：二价体配对正常。整列于赤道面（图版Ⅱ：7，8)。其二价体形态，与金花茶小孢子母细胞减数分裂的形态类似[12]。

后期Ⅰ：后期Ⅰ二价体的分离均表现出明显的不同步（图版Ⅱ：9—11)。从滞留在赤道面的染色体

形态看，它们不是落后的单价体，而似二价体。在金花茶小孢子母细胞减数分裂中，不存在此类异常现象[12]，二价体的分离都是很正常的同步分离。

末期Ⅰ和分裂间期（图版Ⅱ：12，13）：二价体已近均等地完全移向两极，并发生聚缩。赤道面不存在滞留的染色体。这进一步证明，后期Ⅰ滞留于赤道面的不是未配对的单价体。

中期Ⅱ（图版Ⅱ：14，15）：两个姊妹子核的染色体平行排列在两个赤道面。

后期Ⅱ（图版Ⅱ：16）：染色体的分离比较同步，未见如后期Ⅰ的大量滞留染色体。

末期Ⅱ和四分体（图版Ⅱ：17，18）：分至两极的 4 组染色体开始聚缩，随后形成 4 核。未见到明显的壁的形成。

讨 论

1. 组织培养中的愈伤组织的体细胞减数分裂，是此前未见报道过的新现象。我们确认其为体细胞减数分裂，是基于以下基本事实：该愈伤组织没有任何器官的分化，不仅取材时如此，而且现已继代培养 2 年多仍然如此。它不可能来源于分化的花芽器官；行减数分裂的细胞大小与愈伤组织中的分生细胞类似，而明显小于成熟细胞。这是与小孢子母细胞明显不同的，小孢子母细胞明显大于分生细胞或其它药壁细胞；南宁地区自然生长的金花茶，其小孢子母细胞减数分裂，发生在 12 月下旬至 1 月上、中旬。而我们所观察的材料，是经过 6 个世代反复切割继代培养 6 个月后的愈伤组织，于 7 月份作的观察，因此，可以完全排除材料误检的可能；虽然我们没有看到减数分裂的前期分裂相，但已如前述[6]，前期分裂的染色体的配对和交叉等现象，并不能确定其为减数分裂的性质。可以定性其为减数分裂的是其连续的两次分裂和染色体数目减半，并形成四分孢子。我们所观察到的两次连续分裂，由于其体积太小和许多成熟细胞的干扰，使染色体分散状况不尽人意。但其染色体的基本构型和分裂行为，除后期Ⅰ有较大变异外，与小孢子母细胞减数分裂是完全类同的[12]。因此，我们确认是体细胞减数分裂。

2.金花茶体细胞与小孢子母细胞减数分裂的明显区别，是第一次分裂时二价体的分离行为不同。即在体细胞减数分裂中，后期Ⅰ出现大量滞留的染色体，而在小孢子母细胞减数分裂中，二价体在后期Ⅰ是完全同步分离的。由于前述技术上的困难，二价体不能准确计数，因而不能提供无误的证据。但是，从图版Ⅰ: 9—11 的图象中仍然可以看出，分至两极以及滞留在赤道面的染色体，不象是半个二价体或单价体，而更象是完整的二价体。从图 11 中大体可判断，分至两极和滞留在赤道面者，约各含 5 个二价体。因此，我们推测这不是二价体的同源染色体之间的正常分离，而可能是整个二价体的随机分离。由于二价体的两个着丝点取向相反，二价体究竟分向哪一级，需要一个调整过程。因此，才出现大量二价体滞留于赤道面的现象。否则，无法解释这一异常现象。我们提出后期Ⅰ分至两极的是二价体，从中期Ⅰ、后期Ⅰ和中期Ⅱ的染色体形态看，是非常类似的。在正常的减数分裂中，上述 3 个时期的染色体形态则是完全不同的。因此，上述推测并不是臆测的。

如果上述的推测有一定的合理性，则这将是一次特殊的减数分裂，即第一次分裂是二价体之间的分离，第二次分裂是二价体的同源染色体分离，相当于正常减数分裂的第一次分离。具体讲，金花茶的体细胞染色体数为 $2n=30$，可表述为：$2n=30=15Ⅱ$ 经第一次分裂变成 $7Ⅱ+8Ⅱ(n)$, 经第二次分裂变成 $7Ⅰ+7Ⅰ+8Ⅰ+8Ⅰ(1/2\ n)$。上述说明染色体经过两次减数，最后产物只含 $1/2\ n$ 的染色体数。但就 DNA 含量变化而言，则与正常减数分裂类同。这种特殊的减数分裂方式，可能暗示这是金花茶祖先的原始基因组（Genome）的返祖分离现象。也就是说，金花茶可能是 $x=7$ 和 $x=8$ 的两个原始种杂交而产生的双二倍体或称异基数异源四倍体，类似于“胜利油菜”的起源。与现今植物分类学家公认的被子植物染色体数 $n>13$ 者为古多倍体起源和被子植物的原始基数 $x=7$ 的观点是吻合的。剑桥大学的 Bennett[13] 用三维重构技术对大麦和黑麦的杂种 F1 的细胞中染色体的空间分布进行了多年研究，提出

了“自然核型”理论，指出两亲本的染色体组在杂种细胞中是独立分布的。这为杂种亲本基因组的独立分离提供了理论依据。此外，在自然条件下，植物的细胞分裂和生长发育，都受到基因的严格调控，而在细胞和组织培养中，它则是或多或少摆脱了这种调控的开放系统，大量事实证明，各种隐性性状或突变，都易于在组培中出现。因此，我们推测的这种反常的减数分裂的出现，也不是不可能的。有些观察资料是值得深思的，三叶橡胶（*Hevea brasiliensis*）为异源四倍体，2n＝4x＝36， x＝9，木本植物，与金花茶类似。在三叶橡胶花药培养产生的胚状体再生株以及再生株的芽接成活苗的根尖和幼叶细胞中，其染色体数主要集中为 9，18 和 27。其中含 9 条染色体的细胞约占观察细胞总数的约 4%〔14,15〕。以上事实说明，这含 9 条染色体的细胞是能独立生存和增殖的，否则不能在胚状体和再生株中均存在。这 9 条染色体的细胞正相当于三叶橡胶的 1／2 n 或 x 的染色体数，也即一个原始祖先的基因组的染色体数。那么，这含 9 个染色体的细胞是如何产生的，是否也象我们推测那样，是一种原始亲本单个基因组的返祖分离现象？或者象金花茶一样以一种特殊的减数分裂所产生？这是一个值得深入探讨的问题。我们在金花茶愈伤组织中，也观察到一些含 7 和 8 条染色体的细胞（图版Ⅰ：4）。两种不同的异源四倍体木本植物的花药培养的产物，都存在含单个基因组的细胞，为我们的上述推测提供了有价值的佐证。

我们所观察到的金花茶花药愈伤组织中的体细胞减数分裂现象，是真实存在的。我们对其分裂中的异常行为的推测说明，旨在提出新的思维启示，抛砖引玉。如果这一推测能得到更充分的证实，便有可能利用细胞工程技术和人工培养方法，从多倍体植物中分离并获得其祖先类型。这对多倍体植物的起源研究以及对遗传育种实践，都可能具有潜在的重大意义。

参 考 文 献

〔1〕Huskins C L. Chromosome multiplication and reduction in somatic tissues. *Nature* (Lond.), 1948, **161**: 80—83.

〔2〕Huskins C L, Cheng K C. Segregation and reduction in somatic tissues Ⅳ, Reduction groupins induced in *Allium cepa* by low temperature. *J Hred,* 1950, **41:** 13—18.

〔3〕Wilson G B, Cheng K C. Segregation and reduction in somatic tissue. *J Hered,* 1949, **40:** 3—6.

〔4〕Storey W B. Somatic reduction in *Cycads. Science* (N.Y), 1968, **159:** 648—650.

〔5〕Riger R, et al. A glossary Genetics and Cytogenetics, Classical and molecular. 4th ed., Berlin: Springer-Verlag, 1976.

〔6〕Mitra J, Steward F C. Growth induction in cultures of *Haplopappus gracillis,* 11. The behavior of the nucleus. *Amer J Bot,* 1961, **48**(5): 358—368.

〔7〕闵天禄, 张文驹. 山茶属古茶组和金茶茶组的分类学问题. 云南植物研究, 1993, **15**(1): 1—15.

〔8〕曹慧娟, 李天庆. 一些山茶属植物的细胞染色体研究. 北京林业大学学报, 1986, **8**(2): 35—41.

〔9〕秦新民, 梁倩华. 三种金花茶及其组培苗的核型比较. 云南植物研究, 1991, 13(1): 51—57.

〔10〕秦新民, 梁倩华.金花茶组培苗的核型分析. 广西植物, 1990, **10**(3): 208—210.

〔11〕Tiaojiang Xiao, Zhijian Gu, Lifang Xia , K Condo. A karyomorphological study of ten species of Chinese *Camellia. La Kromosomo,* 1991, **11—16:** 2051—2058.

〔12〕李天庆, 曹慧娟. 金花茶雄配子体的发生和发育. 北京林业大学学报, 1986, **8**(2): 30—34.

〔13〕Bennett M D. The genome, The natural karyotype and Biosystematics. in W. F. Grant(ed.) Plant Biosystematics. Academic Press, Canada. 1984. 41—66.

〔14〕岑 明等. 三叶橡胶花药培养过程中的倍性观察. 遗传学报, 1981, **8**(2): 175—179.

〔15〕Chen Z H, Qian C F. Recent advances in anther culture of *Hevea brasiliensis* (Mueii-Arg.). *Theor Appl Genet,* 1982, **62:** 103—108.

图版说明

图版 I　1. 金花茶花药愈伤组织, 继代培养 6 月后的形态; 2. 愈伤组织的局部切片, 示分生组织细胞群(箭头); 3, 4. 愈伤组织的有丝分裂染色体: 3. 2n = 30 的细胞; 4. 含 8 个染色体的细胞; 5, 6. 愈伤组织的体细胞与减数分裂细胞大小的比较: a. 液泡化体细胞, b. 减数分裂末期 II 细胞, c. 分生细胞, d. 减数分裂中期 I 和分裂间期细胞.

图版 II　7—8. 金花茶花药愈伤组织的体细胞减分裂

7—8. 中期 I ; 9—11. 后期 I ; 12. 末期 I ; 13. 分裂间期; 14,15. 中期 II ; 16. 后期 II ; 17. 末期 II ; 18. 四分体.

Explanation of Plates

Plate I　1. Anther callus clumps of *Camellia petelotii,* after subcultured for 6 months. 2. Portion of a paraffin section of a callus clump, show meristimatic cells(arrow); 3, 4. Mitotic chromosomes of callus cells.

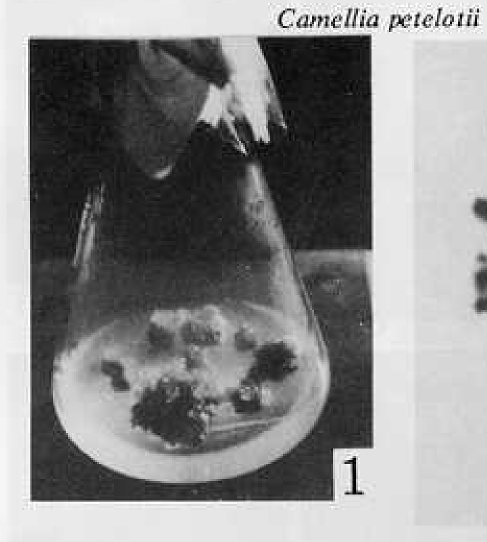
3. A cell with 2n = 30, 4. A cell with 8 chromosomes; 5,6. Comparison in sizes between somatic and meiotic cells:

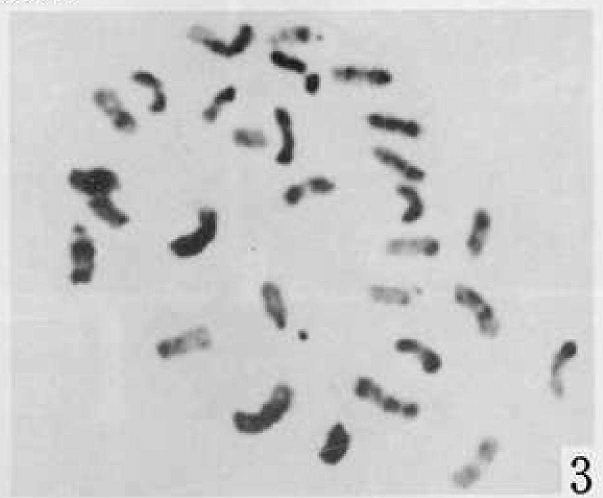
a. Vaculated cells; b. Meiotic telophase II cell; c. Meristimatic cells; d. Meiotic metaphase I and interkinesis cells.

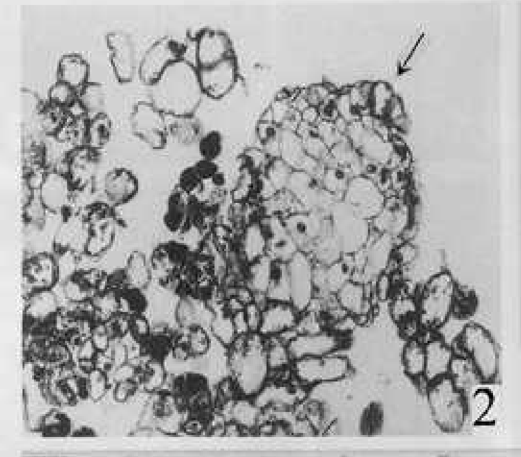
Plate II　Somatic meiosis of anther callus cells in *Camellia petelotii.*

7,8. Metaphase I , 9—11. Anaphase I ; 12. Telophase I ; 13. Interkinesis; 14, 15. Metaphase II ; 16. Anaphase II ; 17. Telephase II ; 18 Tetrad.

LI Mao-Xue et al: Somatic Meiosis of Anther Callus Culture in *Camellia petelotii*





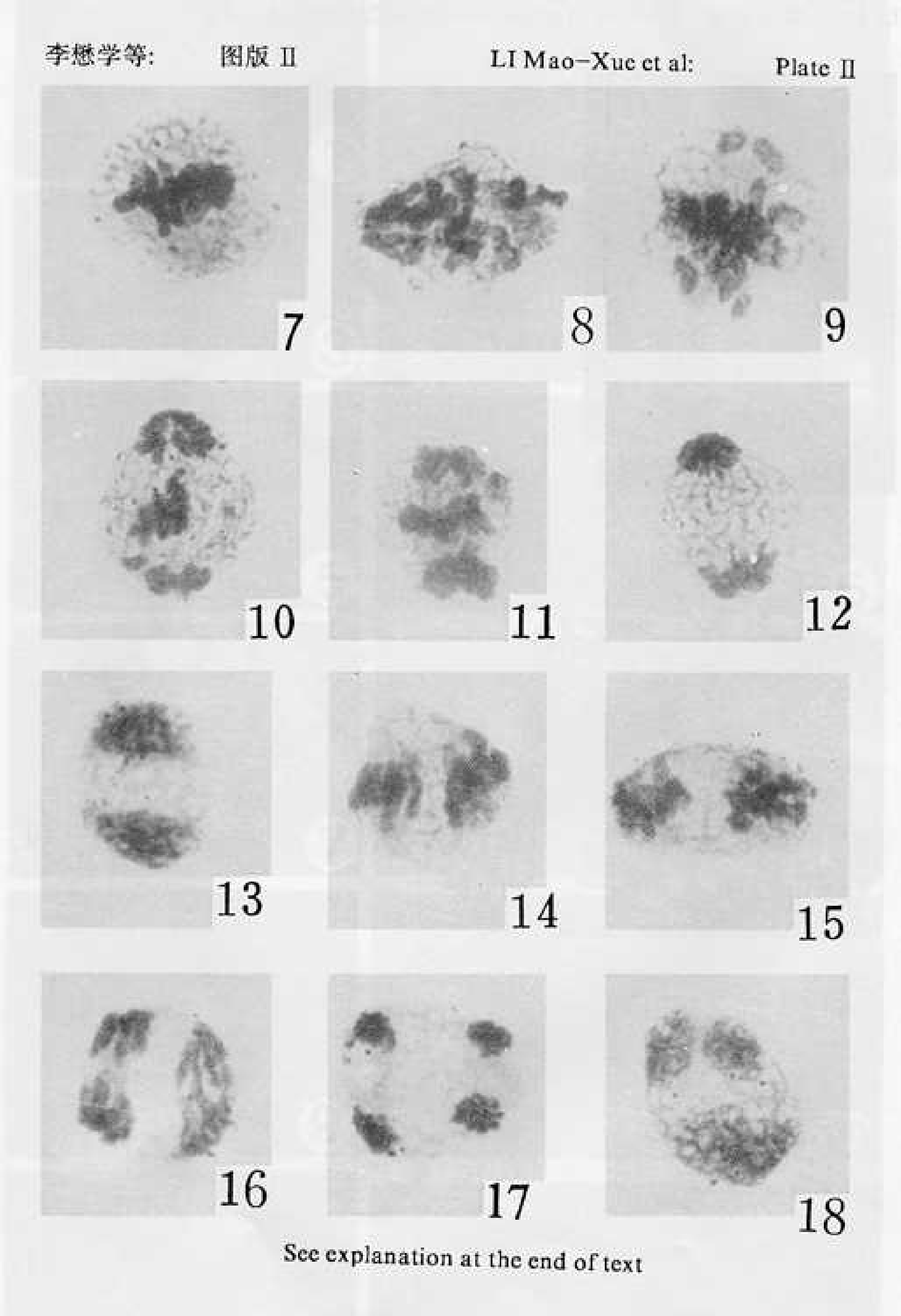








See explanation at the end of text



See explanation at the end of text